

Development and Clinical Application of a Chemiluminescence Immunoassay for Determination of Carbohydrate Antigen 125

Zhiwen Dai, Zhenxian Dai, Jianqing Zhang, Yuling Xie, Zhenxiang Xue, Yushui Wu

Fujian Hongcheng Bio-Pharmaceutical Co., Ltd., Putian Fujian
Email: wawater@126.com

Received: Aug. 17th, 2016; accepted: Sep. 5th, 2016; published: Sep. 8th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.
This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).
<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

To develop a chemiluminescence immunoassay (CLIA) kit for quantitative determination of tumor marker carbohydrate antigen 125 (CA125) and evaluate its value of clinical application, CLIA for quantitative determination of CA125 was established by using micro-plates coated with antibody to CA125, combined with HRP conjugated anti-CA125 antibody, as well as luminol chemiluminescence substrate system. The national reference control sera were used for evaluation of specificity, sensitivity, stability and accuracy of the established CLIA. CA125 levels in sera from 350 clinical samples were parallel determined by the established methods and reference kits produced by the Siemens. The results show that the efficiency of the CLIA reagents met the requirements of national reference standard. The intra coefficient variations (CV) were between 2.8%~3.6% and inter CV 3.7%. The kit showed good stability after being kept at 37°C for 3d. The established CLIA showed good correlation with the reference kits (negative concordance rate, positive concordance rate and overall concordance rate were 99.5%, 99.3% and 99.4% respectively, and a correlation coefficient $r = 0.9897$. High degree of agreement was observed with a *Kappa* value of 0.99). A rapid, specific, sensitive and stable CLIA kit for quantitative determination of CA125 was successfully established and that will be fit for widely application in clinical laboratory.

Keywords

Carbohydrate Antigen 125, Chemiluminescence, Determination

糖类抗原125化学发光免疫定量检测试剂的研制与临床应用

戴志文, 戴振贤, 张剑清, 谢玉玲, 薛正翔, 吴玉水

文章引用: 戴志文, 戴振贤, 张剑清, 谢玉玲, 薛正翔, 吴玉水. 糖类抗原 125 化学发光免疫定量检测试剂的研制与临床应用[J]. 免疫学研究, 2016, 4(2): 9-14. <http://dx.doi.org/10.12677/is.2016.42002>

福建省洪诚生物药业有限公司, 福建 莆田
Email: wawater@126.com

收稿日期: 2016年8月17日; 录用日期: 2016年9月5日; 发布日期: 2016年9月8日

摘要

为了研制肿瘤标志物糖类抗原125(CA125)化学发光免疫定量检测试剂, 并分析其临床应用价值, 将CA125单抗包被微孔板, 以辣根过氧化物酶标记的CA125抗体为二抗, 结合鲁米诺化学发光底物系统, 建立CA125化学发光免疫定量检测方法。用CA125检测试剂国家参考品质控血清分析所建立方法的特异性、灵敏度、稳定性和精密性等试剂性能, 并与进口的CA125定量检测试剂同时检测临床血清样本350例, 比较检测结果。结果表明所研制的试剂性能符合CA125检测试剂国家参考品质标准。批内变异系数2.8%~3.6%、批间变异系数3.7%; 试剂盒置37℃孵育3d, 其稳定性良好。临床样本比对检测结果表明, 两种方法相关性良好(相关系数 $r = 0.9897$, 阴性符合率99.5%、阳性符合率99.3%, 总符合率为99.4%, $Kappa$ 值为0.99, 一致性强度为最强)。本文成功研制了快速、特异、敏感和稳定的肿瘤标记物CA125化学发光免疫定量检测试剂并建立其检测方法, 适合临床检验推广应用。

关键词

糖类抗原125, 化学发光, 检测

1. 引言

肿瘤标志物的血清含量水平与恶性肿瘤的发生、发展、消退、复发等具有良好的相关性。定量检测肿瘤标志物的血清含量对相关恶性肿瘤的早期诊断、疗效和预后判断等均有重要参考价值。然而, 目前发现的用于肿瘤筛查诊断的标记物在患者体内含量很低, 一般检测方法不够敏感, 难于精确定量测定。化学发光免疫检测技术具有灵敏度高、线性范围宽、光信号持续时间长、结果稳定、重复性好、检测快速且无环境污染、便于自动化及实验室之间的标准化等优点[1]。

卵巢癌是女性常见的恶性肿瘤, 其5年生存率仅为30%, 死亡率居妇科肿瘤之首[2]。因此, 卵巢癌的早期诊断筛查至关重要。CA125是卵巢癌和子宫内膜癌的首选标志物, 是用于卵巢癌的早期诊断、疗效观察、预后判断、监测复发及转移的最重要指标。国内外目前已广泛应用其进行卵巢癌的病情检测、诊断和疗效判定等[3]-[5]。目前国内临床实验室大多采用国外的检测系统, 检测成本高昂。因此, 研制肿瘤标志物化学发光免疫定量检测试剂具有重要的社会效益和经济效益。本文报道糖类抗原125(CA125)肿瘤标志物化学发光免疫定量检测试剂的研制及其初步临床应用评价。

2. 材料与方方法

2.1. 样本来源

解放军临床检验医学研究所2011年08月22日至2011年11月04日临床血清样本350份, 所有血清均置于-20℃保存待检。男64份, 女286份, 年龄12~92岁, 平均51.6岁。伦理说明: 本次研究样本为受试者在临床诊疗过程中正常采集标本的剩余标本, 检测结果仅作为研究试剂的临床性能评估, 不对病人发布, 且不作为临床诊治依据; 同时承诺不泄露与病人隐私权有关的任何信息。因此, 样本的获得或研究结果对受试者几乎没有风险性, 可不提交伦理委员会审评及受试者的知情同意书。

2.2. 主要试剂与仪器

鲁米诺发光底物液(自制); CA125 标准品、CA125 包被抗体和辣根过氧化物酶标记的 CA125 抗体均购自美国 Fitzgerald 公司; CA125 检测试剂国家参考品购自中国药品生物制品检定所(批号: 1846-0101); HC-CLA-III 化学发光分析仪(洪诚公司产品); 洗板机(北京天石公司); 对照试剂为: 西门子公司生产的 CA125 定量检测试剂(批号: 128533); 白色不透明微孔板购自深圳市金灿华实业有限公司。

2.3. 方法

2.3.1. 校准品的配制

将 CA125 抗原原液标定后溶于小牛血清中, 配制成含 0、10、40、100、200、500 U/mL 的校准品溶液。

2.3.2. Anti-CA125-HRP 溶液的制备

用含有 50% 小牛血清的 PBS 将 HRP 标记的 CA125 抗体作适当稀释, 2℃~8℃ 下保存备用。

2.3.3. 抗体包被板的制备

将 CA125 包被抗体用 0.05 mol/L、pH 9.6 的碳酸盐缓冲液作不同浓度稀释后, 向微孔板各孔中加入 100 μ L, 4℃ 包被过夜, 弃去包被液, 加入含 10 g/L 牛血清白蛋白的 PBS 缓冲液封闭, 4℃ 封闭过夜。弃去封闭液, 除湿干燥后备用。

2.3.4. 实验方法

采用双抗体夹心法检测 CA125。设校准品(0, 10, 40, 100, 200, 500 U/mL)共 6 孔以及待检样品孔等; 向微孔板中加入校准品或样品(每孔 25 μ L), 再加酶结合物 50 μ L, 37℃ 温育 60 min, 洗孔 5 次, 拍干。加发光底物液 A 和 B 每孔各 50 μ L, 混匀后室温避光放置 10 min。用化学发光分析仪测量各孔相对发光值(RLU)。绘出剂量 - 反应曲线, 从剂量 - 反应曲线求得样品的 CA125 浓度。

2.4. 试剂性能评估

2.4.1. 准确性实验

将研制的三批次(批号: 120618、120628、120708) CA125 化学发光免疫定量检测试剂分别用于测定 CA125 国家参考品(检测方法同上), 其结果的相对偏差应在 $\pm 10\%$ 以内。

2.4.2. 灵敏度

平行测定 20 孔零值校准品血清, 以 $S_0 + 2SD$ 作为试剂盒的最低检测浓度。要求分析灵敏度 ≤ 1 U/ml。

2.4.3. 精密度

平行测定两个不同浓度(30 U/mL 和 500 U/mL)的质控血清各 10 孔, 求出批内和批间变异系数。

2.4.4. 特异性实验

用不同浓度的其他肿瘤标志物, 包括甲胎蛋白(400 ng/mL)、癌胚抗原(80 ng/mL)、前列腺特异抗原(80 ng/mL)、糖类抗原 50 (160 U/mL)、糖类抗原 15-3 (500 U/mL)、糖类抗原 19-9 (400 U/mL)与研制的 CA19-9 抗体包被板进行交叉反应(检测方法同上), 其测定结果均应小于 5.0 U/mL。

2.4.5. 稳定性实验

将所研制的 CA125 化学发光诊断试剂(批次: 120708)置 37℃ 3d 后, 用于 CA125 检测试剂国家参考品的测定分析(检测方法同上), 其测定结果应符合各项产品质量标准要求。

2.5. 与进口对照试剂比对

将研制的 CA125 检测试剂(考核试剂, 批次: 120221)与西门子公司生产的 CA125 定量检测试剂盒(对照试剂, 批次: 128533)同时对 350 份临床样本进行比对检测。严格按照试剂盒中操作步骤进行检测, 并在试剂盒有效期内使用。以正常人血清的 CA125 含量小于 35 U/mL 为判定标准, 将临床样本的检测值按照阴阳性结果进行统计学分析, 求出灵敏度、特异性和总符合率; 并对两种试剂的测定值进行相关性分析, 求出相关系数 r 值。考核试剂与对照试剂检测结果之间的一致性比较采用 $Kappa$ 值进行分析。

3. 结果

3.1. 剂量 - 反应曲线

以所配制校准品浓度的对数为横坐标, 发光值的对数为纵坐标, 用双对数数学模型 Log-Log 函数处理, 剂量 - 反应曲线线性方程 $Y = 0.9972X + 2.464$, 线性相关系数 $r = 0.9992$, 表明所建立的化学发光免疫定量检测方法具有良好的剂量反应线性关系(见图 1)。

3.2. 准确性

三批试剂(批号: 120618、120628、120708)用于测定 CA125 定量检测试剂国家参考品, 检测结果均符合质量标准(质量标准及检测结果见表 1)。

3.3. 稳定性

将所研制的试剂(批次: 120708)置 37°C 3 d 后, 用于 CA125 检测试剂国家参考品的测定分析。测定结果表明试剂的各项性能符合产品质量标准要求(见表 1)。

3.4. 特异性

检测结果表明其他肿瘤标志物, 包括甲胎蛋白(400 ng/mL)、癌胚抗原(80 ng/mL)、前列腺特异抗原(80 ng/mL)、糖类抗原 50 (160 U/mL)、糖类抗原 15-3 (500 U/mL)、糖类抗原 19-9 (400 U/mL)的测定结果均小于 5 U/mL, 符合质量标准要求。

3.5. 与进口对照试剂比对

以进口对照试剂西门子的 CA125 试剂盒检测结果为参照标准, 特异性(阴性符合率)为 99.5%; 灵敏

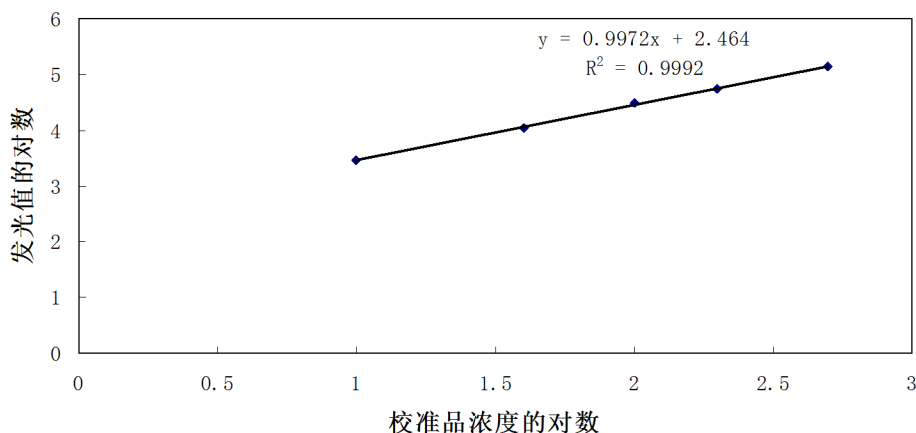


Figure 1. Dose-response curve of the established kit
图 1. 试剂盒的剂量 - 反应曲线

度(阳性符合率)为 99.3%;总符合率为 99.4% (见表 2);两种试剂检测结果的一致性分析:Kappa 值为 0.99,一致性强度为最强(0.81~1.0);两种方法检测结果具有良好相关性(相关系数 $r = 0.9897$, 见图 2)。

4. 讨论

糖类抗原 125 (CA125)存在于上皮性卵巢癌组织和病人的血清中,主要用于辅助诊断恶性浆液性卵巢癌,上皮性卵巢癌,同时也是卵巢癌术后、化疗后疗效观察的指标。CA125 不仅是卵巢癌的特异性标志物,输卵管腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、胰腺癌、肠癌、乳腺癌和肺癌患者 CA125 的水平也会升高。卵巢癌病人血清 CA125 水平明显升高,手术和化疗有效者 CA125 水平很快下降。若有复发时,CA125 升高可先于临床症状之前。其他非卵巢恶性肿瘤也有一定的阳性率,如乳腺癌、胰腺癌、胃癌、肺癌、结

Table 1. Results of SFDA references measured by the established CA125 kit

表 1. CA125 检测试剂国家参考品测定结果

	质量标准	批号			稳定性实验
		120618	120628	120708	批号 120708
准确性	$\pm 10\%$	103.5	99.7	101.1	105.3
线性	$r \geq 0.9900$	0.9997	0.9999	0.9998	0.9999
敏感性	$\leq 1.0 \text{ U/mL}$	0.1	0.1	0.1	0.1
质控血清	L: 24~36 U/mL	32.1	32.0	30.6	32.8
	H: 400~600 U/mL	503.4	500.0	494.2	532.4
重复性	批内 CV $\leq 15.0\%$	2.8	3.6	3.0	3.7
	批间 CV $\leq 15.0\%$	三批试剂的批间 CV 值 3.4%			/

Table 2. Comparison of results detected by the two kits

表 2. 两种试剂检测结果对比

		对照试剂		合计
		阳性	阴性	
考核试剂	阳性	149	1	150
	阴性	1	199	200
	总数	150	200	350

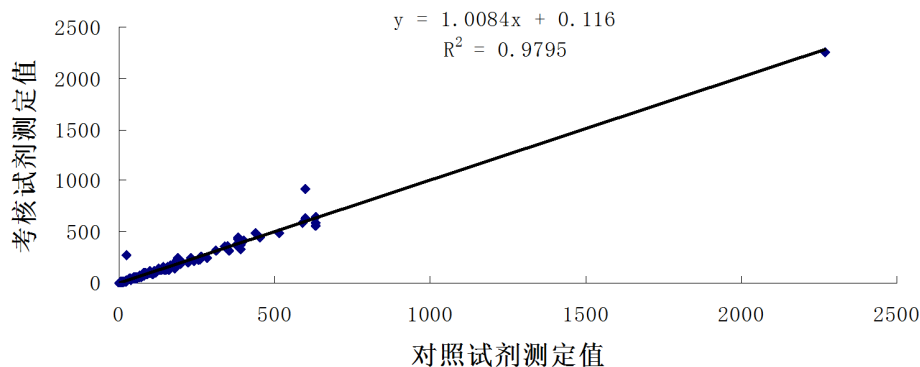


Figure 2. Correlation between CA125 concentration measured by the two kits

图 2. 两种试剂盒所测浓度值的相关性分析

肠直肠癌、其他妇科肿瘤等，但阳性率较低。黄伟等实验结果表明血 CA125 检测在恶性胸水与结核性胸水、肺结核与肺炎鉴别诊断中有重要的临床价值[6]。

化学发光免疫法同时具备了高灵敏度、高特异性、定量检测范围宽、无环境污染的优点，而且其检测用仪器兼容性好，价格相对便宜易于普及和推广，因此近几年来在国内发展迅猛[1]。然而，目前国内用于化学发光免疫法测定用的试剂大都以进口试剂为主，这些试剂与所用仪器采用封闭式系统，使得试剂与仪器必须相互依赖、相互配套，同时由于进口试剂和仪器的价格比较昂贵，也不利于在国内的普及和推广。因此，研制肿瘤标志物化学发光免疫定量检测试剂具有重要社会效益和经济效益。

我们采用 CA125 单抗包被微孔板，以辣根过氧化物酶标记的 CA125 抗体为二抗，结合鲁米诺化学发光底物系统，研制了 CA125 化学发光免疫定量检测试剂；并建立了一步法双抗体夹心检测方法，70 分钟即可完成试验，快速简便。所研制的检测试剂性能符合 CA125 定量检测试剂国家参考品质量标准。试剂的批内变异系数 2.8%~3.6%、批间变异系数 3.7%；试剂盒置 37℃ 孵育 3d，其稳定性良好。并且与其他的肿瘤标志物无交叉反应，特异性高。与进口西门子对照试剂同时检测临床血清样本 350 份，两种方法相关性良好(相关系数 $r = 0.9897$)。以正常人血清的 CA125 含量小于 35 U/mL 为判定标准，将临床样本的检测值按照阴阳性结果进行统计分析，结果是阴性符合率 99.5%、阳性符合率 99.3%，总符合率为 99.4%，*Kappa* 值为 0.99，两种方法检测结果的一致性强度为最强，表明所研制的 CA125 化学发光免疫定量检测试剂与市售的进口同类产品同效。本文成功研制了快速、特异、敏感和稳定的肿瘤标志物 CA125 化学发光免疫检测试剂并建立其检测方法，适合在临床上推广应用。

基金项目

福建省科技重大专项专题子课题(2011YZ0002-1)。

参考文献 (References)

- [1] 汪晨, 吴洁, 宗晨, 等. 化学发光免疫分析方法与应用进展[J]. 分析化学, 2012, 40(1): 3-10.
- [2] Holschneider, C.H. and Berek, J.S. (2000) Ovarian Cancer: Epidemiology, Biology, and Prognostic Factors. *Seminars in Surgical Oncology*, **19**, 3-10. [http://dx.doi.org/10.1002/1098-2388\(200007/08\)19:1<3::AID-SSU2>3.0.CO;2-S](http://dx.doi.org/10.1002/1098-2388(200007/08)19:1<3::AID-SSU2>3.0.CO;2-S)
- [3] 王莉, 李娜, 吴小华, 等. 间皮素和 CA125 在卵巢上皮性肿瘤中的共定位表达及临床意义[J]. 肿瘤, 2009, 29(4): 358-560.
- [4] 胡元晶, 李娜, 曲芑芑, 等. 晚期卵巢癌化疗中 CA125 下降的临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2010, 37(18): 1062-1063.
- [5] Meyer, T. and Rustin, G.J. (2000) Role of Tumour Markers in Monitoring Epithelial Ovarian Cancer. *British Journal of Cancer*, **82**, 1535-1538.
- [6] 黄伟, 项杰. CA125 在肺部疾病鉴别诊断中的应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(6): 444-445.

期刊投稿者将享受如下服务：

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>